

ATPase (MsiK)を用いた新規オリゴ糖輸送系タンパク質の探索

齋藤 明広

(千葉大学大学院 融合科学研究科)

研究の目的

生態系では生物遺骸が時間的にも量的にも不規則に生じる。微生物は、これらの生物遺骸に含まれる物質を迅速に識別し、効率的に分解・利用するシステムをもつ。我々の研究グループでは、微生物の持つ生体高分子の認識・分解・輸送・代謝システムを総合的に明らかにすることを通じて、バイオマス利用（例えば、有用オリゴ糖生産）やバイオコントロールの技術開発に資する基盤的知見を得ることを目指している。

これまで、土壌での代表的な生体高分子分解微生物である放線菌の物質の認識・分解系への考察を深めるため、モデル放線菌の一つ *Streptomyces coelicolor* A3(2) を対象とし、キチン（アセチルグルコサミンを構成単位とする多糖）の認識・分解・輸送系について研究してきた。キチナーゼ遺伝子（以下、*chi*）の構造と転写制御現象を明らかにする¹⁻³）とともに、キチン分解二糖である N,N' ジアセチルキトビオース [(GlcNAc)₂] の細胞内への輸送が、*chi* 遺伝子の発現誘導に必須であることを示した⁴。 *S. lividans* において、セロビオース（セルロース分解二糖）とキシロビオース（キシラン分解二糖）の輸送活性が、セルラーゼとキシラナーゼの生産誘導にそれぞれ必須であること⁵）を合わせると、*Streptomyces* 属放線菌での多糖分解酵素の生産誘導には、それぞれに対応する二糖の細胞内への輸送が必須であると考えられる。

Streptomyces 属放線菌での二糖輸送系は、二つの (GlcNAc)₂ 輸送系 NgcEFG⁶ と DasABC⁷ が発見される以前から、マルトース輸送系 MalEFG⁸、セロビオース輸送系 CebEFG⁹、キシロビオース輸送系 BxlEFG¹⁰ が知られている。これらはいずれも ABC (ATP-binding cassette) 輸送系 (図1) である。興味深いことに、これらの輸送系の全ては、同一のATPaseサブユニットMsiKとともに機能すると考えられている^{4,9}。 *msiK* が培地中に存在する糖質の種類にかかわらず転写されるのに対し、輸送系受容体遺伝子 *malE*, *cebE*, *bxlE*, *dasA* は各々の輸送糖質によって転写誘導される⁴。

S. coelicolor のゲノムには、オリゴ糖とポリオール（以下、OSP）の輸送に関わると考えられるABC輸送系（以下OSP-ABC輸送系）遺伝子群が37セット存在する

（ABCISSEデータベースより計数）。他の真正細菌では、OSP-ABC輸送系遺伝子群1セットに対して特異的なATPaseサブユニット遺伝子が一つずつ存在する傾向があるのに対し、放線菌では37のOSP-ABC輸送系遺伝子群に対してATPaseサブユニット遺伝子と推定されるものは二つしか存在しない。

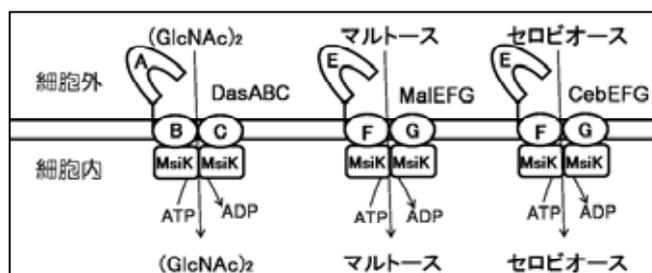


図1. *S. coelicolor*での二糖輸送のモデル。MsiKは、DasABC、MalEFG、CebEFGに共通のATPaseサブユニットであり、それぞれの複合体が各種糖質に対する輸送系として機能する。

これら二つのATPase遺伝子の産物は、37セットのOSP-ABC輸送系に二者択一的に相互作用する可能性が考えられる。本研究では、これらのうちのひとつMsiK^{4,11)}に着目し、その特性を利用することで、*S. coelicolor* のゲノムに存在する28セットの機能不明遺伝子にコードされる輸送系の機能(輸送物質)を明らかにすることを目指している。ここでは、MsiKと相互作用するタンパク質の獲得方法の確立について報告する。

方法

推定プロモータ領域を含む *msiK* 遺伝子を、C末端側にヒスチジンタグ (Hisタグ) が付加されるように設計したプライマーを用いて増幅した。増幅された断片を放線菌用プラスミドベクター-pWHM3 に挿入した後、*S. coelicolor* A3(2)の *msiK* 破壊株ASC3⁴⁾ に導入し、形質転換株ASC3-b2 を作成した。また、ASC3 株にプラスミドベクターのみを導入したASC3-a1 株を得た。一方、組換えMsiKタンパク質を大腸菌で生産し、精製した後、それを抗原として抗MsiK抗血清を調製した。ASC3-b2 のエンベロープ画分からのHisタグ付きMsiKの獲得は、Chenら¹²⁾の報告を参考にして、ATPaseの拮抗阻害剤であるバナジン酸添加下でのニッケル親和性カラムクロマトグラフィーによって行った。

結果

1) *S. coelicolor* A3(2) *msiK* 変異株での His タグ付き MsiK の生産系の確立

C末端側にヒスチジンタグ (Hisタグ) が付加されるように設計した *msiK* 遺伝子を、土着の推定プロモータを含めて、多コピープラスミドベクターを用いて、*S. coelicolor* A3(2)の *msiK* 破壊変異株ASC3⁴⁾ に導入し、ASC3-b2 株を得た。野生株M145、*msiK* 破壊株ASC3、ベクターコントロールASC3-a1 株、および *msiK* 相補株ASC3-b2 をLB培地で培養し、菌体破碎懸濁液をイムノプロット解析に供した。抗 *msiK* 抗血清を用いたところ、M145 株と *msiK* 相補株ASC3-b2 で、それぞれ約 40 および 45kDaの位置にバンドが検出された。また、抗Hisタグ抗体を用いた結果、ASC3-b2 株においてのみ、約 45kDaのバンドが検出された。これらの結果から、*msiK* 遺伝子破壊株を宿主として、C末端側にHisタグを付加したMsiKタンパク質 (MsiK^{His}) の生産系が確立できたと判断した。

2) MsiK の細胞内局在

S. coelicolor A3(2)の野生株M145および *msiK* 相補株ASC3-b2 を各種糖質の存在下で培養した後、細胞質画分とエンベロープ画分に分画し、イムノプロット解析によってMsiKの局在を調べた。その結果、MsiKは糖質の種類に関係なく、エンベロープ画分で検出されることが判明した。また、MsiK^{His} もエンベロープ画分で検出された。これらの結果から、C末端のHisタグの有無にかかわらず、MsiKは、膜タンパク質と相互作用していることが考えられた。

3) MsiK と相互作用するタンパク質の獲得系の確立

Chenらの方法¹²⁾を参考にすることで、*msiK* 相補株ASC3-b2 のエンベロープ画分から、MsiK^{His} をニッケル親和性クロマトグラフィーによって獲得する実験系を構築できた。

MsiKとともに溶出画分に得られたタンパク質を，野生株M145 やベクターコントロール株ASC3-a1 とSDS-PAGEによって比較したところ，ASC3-b2 株に特異的なタンパク質が検出された。本結果から，MsiKと相互作用すると考えられるタンパク質が本実験系で得られるものと判断した。

結論

本研究によって，MsiK^{His}と相互作用すると考えられるタンパク質を獲得する実験系が確立された。今後，本実験系をもとにMsiKと相互作用するタンパク質を同定し，輸送系未知の糖質に対する新規輸送系を同定することを試みていく。新規輸送系同定の後には，それらの生理機能を解明することはもとより，有用糖質生産への応用へ向けた基盤となる知見を得る予定である。

文献

- (1) Saito, A., Fujii, T., and Miyashita, K. Distribution and evolution of chitinase genes in *Streptomyces* species: involvement of gene-duplication and domain-deletion. *Antonie van Leeuwenhoek*. 84, 7-15 (2003)
- (2) Saito, A., Fujii, T., Yoneyama, T., Redenbach, M., Ohno, T., Watanabe, T., and Miyashita, K. High-multiplicity of chitinase genes in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biosci. Biotech. Biochem.* 63, 710-718 (1999)
- (3) Saito, A., Ishizaka, M., Francisco, P. B. Jr., Fujii, T., and Miyashita, K. Transcriptional co-regulation of five chitinase genes scattered on the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *Microbiology* 146, 2937-2946 (2000)
- (4) Saito, A., Fujii, T., Shinya, T., Shibuya, N., Ando, A., and Miyashita, K. The *msiK* gene, encoding the ATP-hydrolyzing component of *N,N'*-diacetylchitobiose ABC transporters, is essential for induction of chitinase production in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* 154, 3358-3365 (2008)
- (5) Hurtubise, Y., Shareck, F., Kluepfel, D., and Morosoli, R. A cellulase/xylanase-negative mutant of *Streptomyces lividans* 1326 defective in cellobiose and xylobiose uptake is mutated in a gene encoding a protein homologous to ATP-binding proteins. *Mol. Microbiol.* 17, 367-377 (1995)
- (6) Xiao, X., Wang, F., Saito, A., Majka, J., Schlösser, A., and Schrempf, H. The novel *Streptomyces olivaceoviridis* ABC transporter Ngc mediates uptake of *N*-acetylglucosamine and *N,N'*-diacetylchitobiose. *Mol. Genet. Genomics* 267, 429-439 (2002)
- (7) Saito, A., Shinya, T., Miyamoto, K., Yokoyama, T., Kaku, H., Minami, E., Shibuya, N., Tsujibo, H., Nagata, Y., Ando, A., Fujii, T., and Miyashita, K. The *dasABC* gene cluster, adjacent to *dasR*, encodes a novel ABC transporter for the uptake of *N,N'*-diacetylchitobiose in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 3000-3008 (2007)
- (8) van Wezel, G. P., White, J., Bibb, M. J., and Postma, P. W. The *malEFG* gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): characterization, disruption and transcriptional analysis.

Mol. Gen. Genet. 254, 604-608 (1997)

- (9) Schlösser, A., Jantos, J., Hackmann, K., and Schrempf, H. Characterization of the binding protein-dependent cellobiose and cellotriose transport system of the cellulose degrader *Streptomyces reticuli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2636-2643 (1999)
- (10) Tsujibo, H., Kosaka, M., Ikenishi, S., Sato, T., Miyamoto, K., and Inamori, Y. Molecular characterization of a high-affinity xylobiose transporter of *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520 and its transcriptional regulation. *J. Bacteriol.* 186, 1029-1037 (2004)
- (11) Schlösser, A., Kämpers, T., and Schrempf, H. The *Streptomyces* ATP-binding component MsiK assists in cellobiose and maltose transport. *J. Bacteriol.* 179, 2092-2095 (1997)
- (12) Chen, J., Sharma, S., Quijcho, F. A., Davidson, A. L. Trapping the transition state of an ATP-binding cassette transporter: evidence for a concerted mechanism of maltose transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 1525-1530 (2001)